

Е. В. Должикова, Л. Н. Малоштан

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СУППОЗИТОРИЕВ ВАГИНАЛЬНЫХ «МЕЛАНИЗОЛ» НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ КРОЛИКОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

Проведено изучение влияния новых вагинальных суппозиториев «Меланизол», рекомендованных для лечения неспецифических вагинитов, на репродуктивную систему здоровых кроликов-самок при длительном применении. Экспериментально установлено, что суппозитории «Меланизол» в условно-терапевтической дозе и их плацебо в эквивалентном количестве при субхроническом вагинальном введении (рекомендуемый путь введения) самкам здоровых кроликов не вызывают изменений уровня эстрадиола и тестостерона по сравнению с контрольной группой, не вызывают морфологических изменений токсического характера, не оказывают негативного влияния на состояние фолликулярной системы яичников и не влияют на ткани матки и слизистую оболочку влагалища.

Ключевые слова: суппозитории вагинальные, субхроническая токсичность, репродуктивная система, кролики.

ВВЕДЕНИЕ

Аэробный вагинит является следствием изменения нормальной флоры влагалища и сопровождается признаками воспаления, наличием преимущественно аэробных микроорганизмов комменсалов кишечника или других патогенных аэробных микроорганизмов. Клинические симптомы могут варьировать в зависимости от типа и интенсивности и характеризуются высокой тенденцией к рецидивам и хроническому течению. Воспаление и изъязвление при аэробном вагините может увеличить риск заражения инфекциями, передаваемыми половым путем [1].

Причины рецидивирующих инфекций мочеполовой системы у женщин похожи, в том числе у здоровых женщин с нормальным строением мочеполовой системы. По статистике от 30% до 44% женщин имеют рецидив инфекций в течение шести месяцев. Рецидивы, как правило, вызывают одни и те же виды возбудителей, которые вызывали предыдущие инфекции. К факторам риска относятся: половой акт три или более раз в неделю в пременопаузе, использование новых спермицидов, несколько половых партнеров. У женщин после менопаузы, риск в первую очередь увеличивается из-за низких уровней эстрогена. Для лечения данных патологических состояний эффективными являются как короткие курсы антибиотиков, так и более длительные их курсы. Антибиотикопро-

филактика эффективно уменьшает рецидив инфекций мочеполовой системы, но повышает риск развития побочных эффектов и резистентности к антибиотикам [2].

Лекарственные средства, назначаемые в медицинской практике для лечения вагинитов, обладают высокой фармакологической активностью. Однако наряду с положительными эффектами большинство из них обладают и побочными действиями (побочные неаллергические реакции, аллергические реакции и другие эффекты), что ограничивает их возможное широкое и длительное использование [3].

В контексте вышеизложенного представляет интерес создание комплексных средств для использования в терапии вагинитов на основе синтетических и растительных фармацевтических субстанций с высоким фармакологическим эффектом, имеющих ряд преимуществ, основным из которых является уменьшение токсического эффекта синтетического средства и более мягкое воздействие на организм при различных сроках применения [4].

На базе НФаУ группой ученых разработаны новые суппозитории вагинальные «Меланизол» для лечения неспецифических вагинитов и бактериальных вагинозов, в состав которых входят масло чайного дерева и метронидазол [5].

Целью данного исследования явилось изучение возможного токсического влияния новых суппозиториев вагинальных «Меланизол» на уровень половых гормо-

нов и морфологическое состояние половой системы интактных кроликов-самок при условии субхронического введения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение токсичности суппозиторий «Меланизол» при повторном введении половозрелым кроликам-самкам было проведено в течение 30 суток в условно-терапевтической дозе при вагинальном введении (рекомендуемый путь введения) на 12 кроликах-самках массой $2,5 \pm 0,3$ кг. Животные были разделены на 3 группы по 4 в каждой: 1 группа – животные, получавшие суппозитории вагинальные «Меланизол» в дозе 19,56 мг/кг (с учетом суммы действующих веществ), 2 группа – животные, получавшие основу суппозиторий смесь ПЭО 1500:400 (плацебо: негативный контроль) в эквивалентном количестве, для учета возможного ее дополнительного влияния; 3 группа – контрольные животные (интактный контроль), которым не применяли ни тест-образец, ни плацебо. Частота введения суппозиторий и плацебо была 1 раз в сутки.

В течение всего срока введения суппозиторий и плацебо проводили ежедневное наблюдение за животными. На протяжении эксперимента контролировали динамику массы тела животных, как интегрального показателя возможного негативного влияния, начиная с первого дня введения исследуемых образцов 1 раз в 2 недели в утренние часы.

В конце эксперимента у животных проводился забор крови для исследования уровня половых гормонов. Уровни половых гормонов эстрадиола и тестостерона исследовали в плазме крови при помощи тест-наборов для иммуноферментного анализа «Гранум», Украина.

После завершения эксперимента все животные подлежали макроскопическому и микроскопическому исследованию органов и тканей репродуктивной системы.

Животных после завершения эксперимента выводили из опыта в соответствии с этическими принципами экспериментов на животных. Проводили патологоанатомическое вскрытие макроскопическим изучением органов животных. У животных, подвергавшихся плановой эвтаназии, измерялась масса и вычислялись массовые коэффициенты яичников. Гистологические исследования проводили под руководством ст.

научного сотрудника Ларьяновской Ю. Б. Для гистологических исследований отобранные яичники и влагалище животных, которые фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Подготовку образцов для гистологического исследования проводили общепринятыми методами [6]. Образцы обезживали в спиртах возрастающей крепости, погружали в целлоидин-парафин. Микротомированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Уход за животными (включая эвтаназию) в ходе эксперимента осуществляли согласно имеющимся документам, которые регламентируют организацию работы с использованием экспериментальных животных. Были соблюдены принципы «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985) [7], принятых I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2000) и положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы «Statistica 6.0» с использованием параметрических и непараметрических критериев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение 30 суток наблюдений все животные оставались живы, были активны, имели опрятный вид, блестящий мех, кожу без следов повреждения, нормально потребляли корм и воду. Суппозитории вагинальные «Меланизол» в дозе 19,56 мг/кг при вагинальном пути введения не вызвали гибели животных в течение всего периода наблюдения.

Изменения массы тела животных опытных и контрольной групп рассчитывались по сравнению с массой в 1-е сутки введения суппозиторий. Результаты взвешивания кроликов в группах суппозиторий «Меланизол» и плацебо показали прирост массы тела у животных на протяжении всего эксперимента (таблица 1), достоверно не отличающийся от контрольной группы.

Как известно, под влиянием колебания секреции стероидных гормонов яичниками происходят изменения в эпителии

влагалища [8]. Учитывая возможность абсорбции через стенки влагалища в кровь действующих веществ суппозитория, интерес представило изучить их влияние на уровень стероидных гормонов в плазме крови и морфологию половых железы кроликов-самок. Исследование массовых коэффициентов яичников (таблица 1), а также уровней эстрадиола (рисунок 1) и тестостерона (рисунок 2) не выявило до-

стоверной разницы между показателями экспериментальных групп животных и контрольной группы. Соотношение тестостерон/эстрадиол составило в группе интактного контроля 2,9, в группе суппозитории вагинальные «Меланизол» – 2,8, в группе плацебо – 2,9, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния исследуемых средств на уровни половых гормонов и состояние яичников.

Таблица 1 – Динамика массы тела кроликов-самок и относительная масса яичников при условии повторных введений суппозитория вагинальных «Меланизол» ($X \pm \Delta$, $n=4$)

| Группа, доза | Масса тела, г (1 день введения) | Масса тела, г (14 день введения) | Прирост, г | Масса тела, г (30 день введения) | Прирост, г | Массовый коэффициент яичников |
|------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------|----------------------------------|--------------|-------------------------------|
| Меланизол, 19,56 мг/кг | 2410,00±266,58 | 2612,50±282,65 | 202,50±22,17 | 2855,00±311,39 | 445,00±61,37 | 0,0113±0,0023 |
| Плацебо | 2450,00±108,01 | 2666,25±98,60 | 216,25±26,88 | 2911,25±95,43 | 461,25±45,89 | 0,0111±0,0025 |
| Контроль | 2461,25±114,48 | 2662,50±121,42 | 201,25±22,50 | 2988,75±146,08 | 527,50±59,79 | 0,0124±0,0023 |

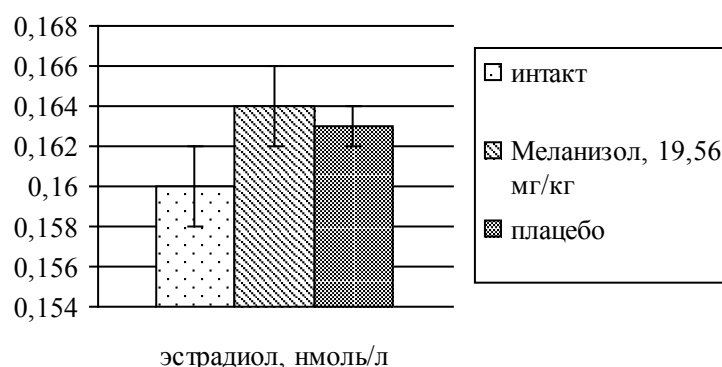


Рисунок 1 – Уровень эстрадиола в плазме крови кроликов-самок в условиях длительного введения суппозитория вагинальных «Меланизол» и плацебо ($X \pm \Delta$, $n=4$)

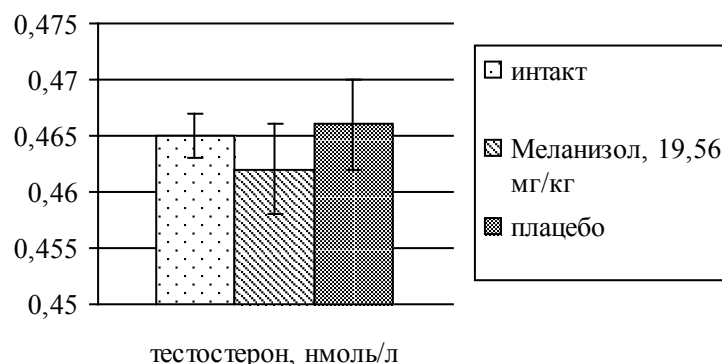


Рисунок 2 – Уровень тестостерона в плазме крови кроликов-самок в условиях длительного введения суппозитория вагинальных «Меланизол» и плацебо ($X \pm \Delta$, $n=4$)

При внешнем осмотре кролики-самки экспериментальных и контрольной групп имели опрятный шерстный покров, нормальные слизистые оболочки, обычные по размеру подкожные лимфатические узлы. При вскрытии не найдено признаков гипо- или гипертрофии органов, нарушений кровообращения, воспаления, опухолевого роста. При исследовании полостей тела не обнаружено наличия патологического содержимого, спаек. Слизистая преддверия влагалища была гладкая, бледно-розовая. Слизистая вагины, устья рогов матки и непосредственно рогов матки зрительно без повреждений.

Морфологические результаты исследования демонстрируют, что в яичниках кроликов-самок (рисунок 3, см. обложку журнала) после применения суппозиторий «Меланизол» и плацебо не отмечено изменений патологического характера. У всех животных прослеживали несколько категорий яйцевых фолликулов. Замечены колебания в численности зрелых яйцевых фолликулов у разных животных, желтые тела очень редко либо не просматривались. Уровень атрезии фолликулов у кроликов-самок различных групп одинаков.

Слизистая рога матки (рисунок 4, см. обложку журнала) у кроликов-самок после введения суппозиторий «Меланизол» и плацебо соответствовала интактному контролю. Во всех исследуемых группах поверхностный эпителий, выстилающий рога матки кролика-самки, однорядный кубический, с вкраплением отдельных пузырьковых клеток. Наблюдались умеренные по численности, глубине и степени расширения маточные железы. Строма эндометрия была рыхлая, содержала много полнокровных тонкостенных кровеносных сосудов. Мышечный слой (миометрий) был отчетливо утолщен.

При гистологическом исследовании слизистой влагалища (рисунок 5, см. обложку журнала) кроликов-самок, получавших суппозитории «Меланизол» в дозе 19,56 и плацебо, не обнаружено негативного их влияния. Дистальная часть влагалища животных исследуемых и контрольной групп была выстлана многослойным плоским ороговевающим эпителием, толщина пласта которого достигала 6–10 рядов клеток. Клетки базального слоя (1–2 ряда) вертикально были ориентированы, ядра находились на одном уровне, митозы были редки. В проксимальной части

базальный слой эпителия кроликов-самок исследуемых групп представлен одним рядом клеток с четко очерченными границами. Поверхностный (функциональный) слой состоял из высокопризматичных эпителиальных клеток, с просветленной цитоплазмой, содержащей мукоидный секрет. Строма была рыхлая, подэпителиально более клеточнонасыщенная, богатая кровеносными сосудами.

Исходя из результатов морфологических исследований, суппозитории вагинальные «Меланизол» в дозе 19,56 мг/кг, как и их основа, при применении в течение 30 суток не вызывают каких-либо изменений стенки влагалища, матки, а также патологических изменений яичников.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что для лечения инфекционных вагинитов используют как короткие, так и более длительные курсы применения антибиотиков. Интерес представило изучение субхронической токсичности суппозиторий «Меланизол» при рекомендуемом вагинальном пути введения.

Установлено, что при длительном (субхроническом) применении суппозитории «Меланизол» в дозе 19,56 мг/кг и их основа (плацебо) при введении в течение 30 суток самкам кроликов не вызывали изменений массы тела животных по отношению к интактным животным.

Учитывая, что воспаление и изъязвление при аэробном вагините может также увеличить всасывание препарата, было исследовано возможное влияние вагинальных суппозиторий «Меланизол» на состояние половых желез и уровень половых гормонов кроликов-самок. Применение суппозиторий «Меланизол» и их основы (плацебо) в течение 30 суток не вызывало патологических изменений уровней половых гормонов эстрадиола и тестостерона и массовых коэффициентов яичников у экспериментальных животных в сравнении с интактными.

При гистологическом исследовании органов репродуктивной системы кроликов-самок установлено, что субхроническое введение суппозиторий «Меланизол» и плацебо не оказывало влияния токсического характера на морфологию матки, на состояние фолликулярной системы яичников и слизистой разных отделов влагалища.

SUMMARY

Ye. V. Dolzhikova, L. N. Maloshtan
THE INFLUENCE OF VAGINAL
SUPPOSITORIES "MELANIZOL"
ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM
OF RABBITS IN CONDITIONS OF
PROLONG ADMINISTRATION

The influence of new vaginal suppositories «Melanizol», recommended for the treatment of nonspecific vaginitis, on the reproductive system of healthy female rabbits in conditions of prolong using has been studied. It was established experimentally that suppositories «Melanizol» in conditionally-therapeutic dose and placebo in an equivalent amount under subchronic vaginal administration (the recommended administration) healthy female rabbits do not cause estradiol and testosterone level changes in comparison with the control group, do not cause the morphological toxic nature changes, do not cause an adverse affect to the ovarian follicular system and do not cause pathological influence on the tissues of uterus and the vaginal mucosa.

Keywords: vaginal suppositories, subchronic toxicity, reproductive system, rabbits.

ЛИТЕРАТУРА

1. Epidemiological, clinical and microbiological findings in women with aerobic vaginitis / T. Dermendjiev [et al.] // *Akush Ginekolog* (Sofia). – 2015. – Vol. 54 (9). – P. 4–8.

2. Arnold, J. J. Common Questions About Recurrent Urinary Tract Infections in Women / J. J. Arnold, L. E. Hehn, D. A. Klein // *Am Fam Physician*. – 2016. – Vol. 93 (7). – P. 560–569.

3. Сарымзакова, Р. К. Пути снижения токсичности и повышения избирательности лекарственных препаратов / Р. К. Сарымзакова, Ю. А. Абдурашитова, Ж. А. Джаманбаев // *Вестник московского университета. Серия 2. Химия*. – 2006. – Т. 47, № 3. – С. 242–244.

4. Изучение острой токсичности и антиоксидантной активности экстракта листьев осины сухого / И. Ю. Лобанова [и др.] // *Фундаментальные исследования*. –

2012. – № 9. – С. 308–312.

5. Протизапальний засіб у формі песаріїв з метронідазолом і олією чайного дерева: пат. 96646 України на винахід: МПК (2011.01), А61К 9/02, А61К 31/4164, А61К 36/61, А61Р 15/00 / Т. Г. Ярних, Ю. В. Левачкова, Л. М. Малоштан, К. О. Степанова; заявитель и патентообладатель Национальный фармацевтический университет. – № а 2010 01 134; заявл. 04.02.2010; дата публ.: 25.11.2011, Бюл. № 22. – 3 с.

6. Меркулов, Г. А. Курс патолого-гистологической техники / Г. А. Меркулов. – М.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. – 424 с.

7. European convention for the protection of vertebral animals used for experimental and other scientific purposes: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.

8. Евсеев, А. А. Вагинальный дисбиоз и методы его коррекции / А. А. Евсеев // *Вестник акушерства и гинекологии*. – 2007. – № 4. – С. 65–69.

9. Степанова, К. О. Дослідження нешкідливості нових комбінованих супозиторіїв «Клімедекс» та «Меланізол» / К. О. Степанова, О. В. Должикова // *Актуальні питання створення нових лікарських засобів: матер. всеукр. наук.-практ. конф. студ. та мол. вчених, присвяч. 140-річчю з дня народження д-ра фармац. та хім. наук, проф. М. О. Валяшко, 21–22 квіт. 2011 р.* : тези доп. – Х.: НФаУ, 2011. – С. 322.

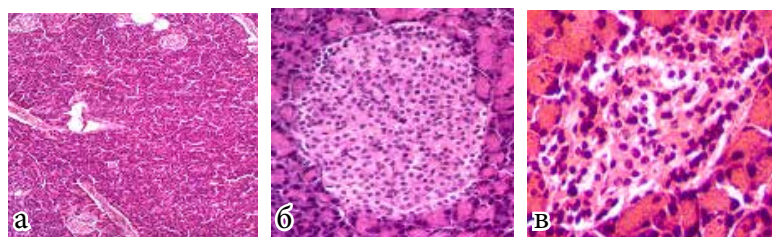
10. Малоштан, А. В. Вивчення гострої токсичності песаріїв «Клімедекс», «Фітовагін», «Меланізол» / А. В. Малоштан, О. В. Должикова, К. О. Степанова // *«Вісник»* : матеріалів міжнародної конференції з питань сучасної медицини: вимоги сьогодення та світова медицина: Матер. міжнар. наук.-практ. конф., Дніпропетровськ, 14–15 верес. 2012 р.: тези доп. – Д.: Організація наукових міжнародних досліджень «Salutem», 2012. – С. 104–105.

Адрес для корреспонденции:

61002, Украина,
г. Харьков, ул. Куликовская, 12,
Национальный фармацевтический университет,
кафедра физиологии и анатомии человека,
e-mail: dolzhikova.elena20@gmail.com,
+38(050)301-10-29,
Должикова Е.В.

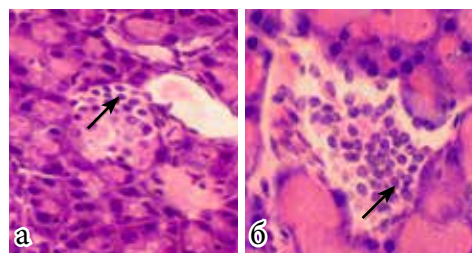
Поступила 14.04.2016 г.

Рисунки к статье Е. Н. Калапко, С. Ю. Штрыголь, Т. В. Горбач, Ю. Б. Ларьяновская, С. И. Мерзликин
«Сравнительный анализ эффективности N,N'-(этан-1,2-дил)бис(хинолин-2-карбоксамида), диакамфа гидрохлорида и метформина в остром периоде аллоксанового сахарного диабета у крыс» (С. 67-77)



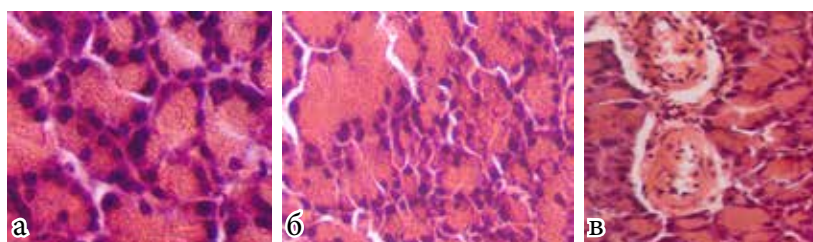
а – увеличение количества панкреатических островков (стрелки);
 б – нормальное содержание β -клеток, мелкий участок пролиферации α -клеток на периферии островка (стрелки); в – уменьшение содержания деструктивно и апоптотически измененных β -клеток

Рисунок 13 – Поджелудочная железа крыс, получавших метформин, через 3 дня после моделирования аллоксанового диабета. Гематоксилин-эозин. х 100 (а), х 200 (б), х 200 (в)



а – опустошение панкреатического островка, зональная пролиферация α -клеток (стрелка); б – диффузная пролиферация α -клеток в полностью опустошенном островке (стрелка)

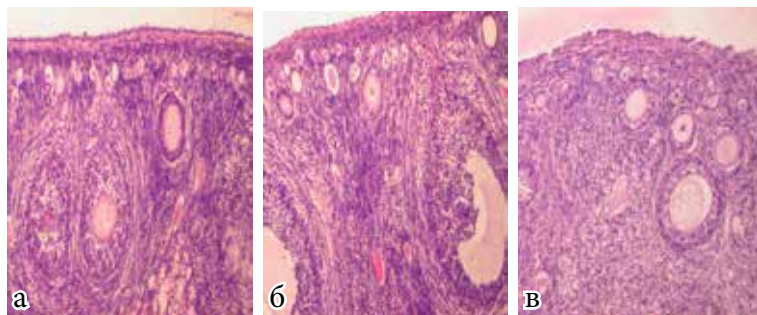
Рисунок 14 – Поджелудочная железа крыс, получавших метформин, через 3 дня после моделирования аллоксанового диабета. Гематоксилин-эозин. х 200 (а), х 250 (б)



а – большая и б – меньшая выраженность по-разному прокрашенных зон в цитоплазме ацинарных клеток; в – нормальное состояние стенки междольковой артерии

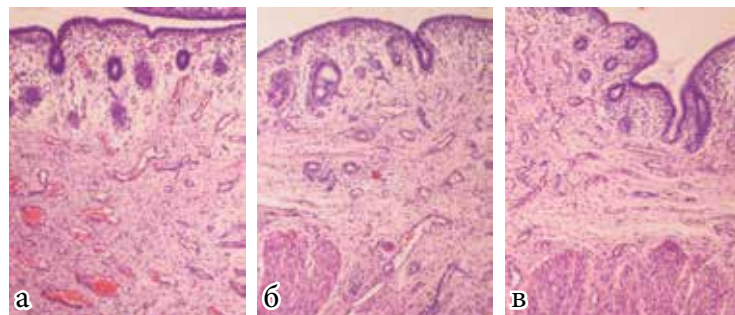
Рисунок 15 – Поджелудочная железа крыс, получавших метформин, через 3 дня после моделирования аллоксанового диабета. Гематоксилин-эозин. х 400 (а), х 250 (б, в)

Рисунки к статье Е. В. Должикова, Л. Н. Малоштан **Изучение влияния суппозиторий вагинальных «Меланизол» на репродуктивную систему кроликов при длительном применении (С. 87-91)**



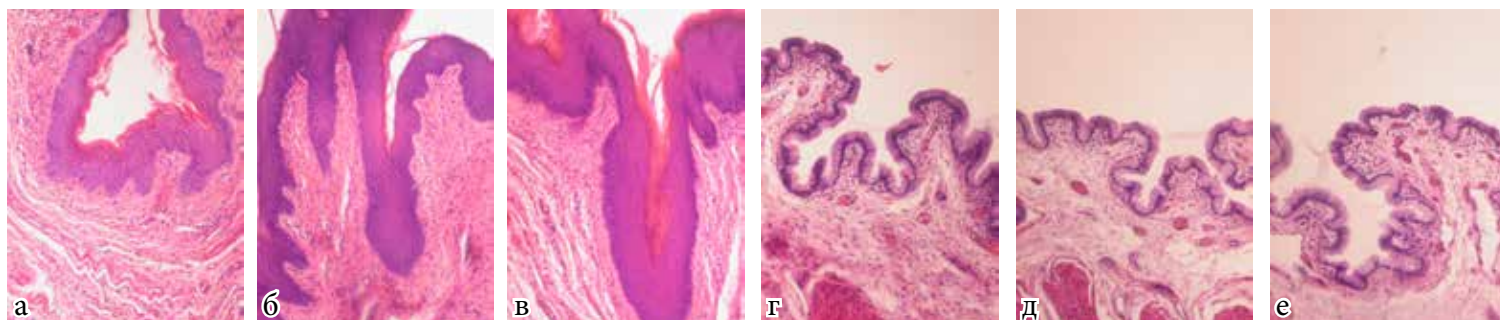
а – интактного; б – после введения суппозиторий «Меланизол»; в – после введения плацебо. Яйцевые фолликулы разной степени развития. Гематоксилин-эозин. х 200.

Рисунок 3 – Яичник кролика-самки



а – интактного; б – после введения суппозиторий «Меланизол»; в – после введения плацебо. Гематоксилин-эозин х 200.

Рисунок 4 – Эндометрий кролика-самки



Дистальная часть (а-в), проксимальная часть (г-е): а, г – интактного кролика; б, д – после введения суппозиторий «Меланизол»; в, е – после введения плацебо. Слизистая без изменений. Гематоксилин-эозин х 200.

Рисунок 5 – Влагалище кролика-самки